

SMART-Seq® mRNA HT

SMART-Seq® mRNA HT (製品コード 634791、634795、および 634796) は、1~100 個の細胞または 10 pg~1 ng の total RNA (RIN ≥8) から高品質の完全長 cDNA を 1 ステップで合成することが可能な試薬です。通常、作業は 4 時間で完了します。cDNA からライブラリー調製まで実施する場合は、SMART-Seq® mRNA HT LP (製品コード 634792、634793 もしくは 634794) および Unique Dual Index Kits (製品コード 634752~634756) をご利用ください。

本日本語版 At-A-Glance は、英語版ユーザーマニュアル Version 051123 に基づいて作成していますが、実際に製品を使用される際には、必ず[英語版ユーザーマニュアル \(最新版\)](#) を参照してください。

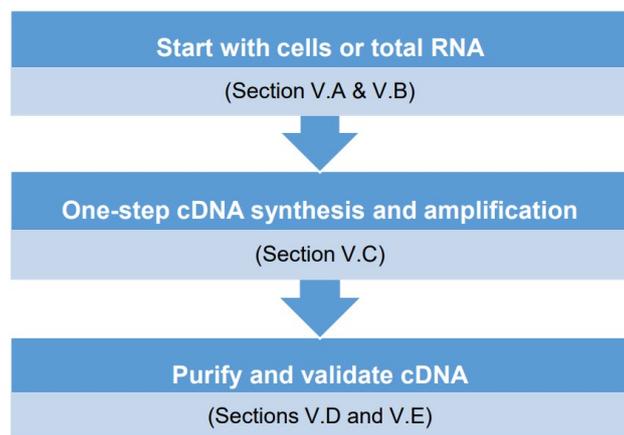


図 1. SMART-Seq® mRNA HT protocol overview

■ 製品に含まれるもの

表 1. SMART-Seq® mRNA HT 構成試薬

SMART-Seq mRNA HT	634795 (24 rxns)	634796 (96 rxns)
Box 1 (Store at -70°C)		
Control Total RNA (1 µg/µl)	5 µl	5 µl
Box 2 (Store at -20°C)		
SMART-Seq HT Oligonucleotide	24 µl	96 µl
3' SMART-Seq CDS Primer II A	48 µl	192 µl
RNase Inhibitor (40 U/µl)	60 µl	150 µl
SMARTScribe™ Reverse Transcriptase (100 U/ µl)	48 µl	192 µl
One-Step Buffer	250 µl	1 ml
SeqAmp™ DNA Polymerase	20 µl	50 µl
10X Lysis Buffer†‡	500 µl	1.85 ml
Elution Buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5)§	1.7 ml	6.8 ml
Nuclease-Free Water†	1 ml	4 ml

■ 保管と取り扱い

キット到着後、Box 1 は-70°C、Box 2 は-20°Cで保管してください。酵素試薬は、使用直前に氷上に移してください。解凍後の試薬は、チューブを短時間ボルテックスおよび遠心機でクイックスピンをします。

■ 開始前に確認しておくこと

- 本アッセイは、サンプル調製時のピペティングの分注精度に敏感です。正しく校正されたピペットを使用してください。
- one-step RT-PCR に関連するすべての試薬は、核酸およびヌクレアーゼフリーのキャビネット内で保管してください。
- 反応液を調製する際、酵素は最後に添加し、穏やかなピペティング操作で混合してください。
- 本キットを使用する際、試薬が適切に機能していることを確認するためにはコントロールを置いてください。

■ 使用するサンプルについて

- 1~100 個のインタクトな細胞または微量の total RNA (10 pg~1 ng) から高品質な cDNA を合成することが可能です。固定化された細胞サンプルには使用できません。
- 希釈の前に培養細胞サンプルから培地除去をするには Mg²⁺- and Ca²⁺-free PBS で 2 回以上洗浄することをお勧めします。細胞をソートする際には、推奨のソーティングバッファーをご使用ください（詳細は英語版ユーザーマニュアルの Section V.A を参照）。
- 本キットで使用可能な RNA の最大液量は 10.5 µl です。
- RNA の精製方法やキットを選択する際には、サンプルの量が適切であるか確認してください。

■ SMART-Seq® mRNA HT Protocol

サンプルの調製

A. ソートされた細胞から開始する場合

- コントロール用も含めて、総サンプル数×1.1 倍量の CSS(CDS Sorting Solution) を調製する。

CDS Sorting Solution (CSS; with 3' SMART-Seq CDS Primer II A):

	Per well	1-18 wells*
10X Lysis Buffer	0.95 µl	19 µl
RNase Inhibitor	0.05 µl	1 µl
3' SMART-Seq CDS Primer II A	1 µl	20 µl
Nuclease-Free Water	10.5 µl	210 µl
Total volume	12.5 µl	250 µl

※少ない量でピペティングするため、250 µl 以上（18 ウェルに必要な量）の CSS を準備する。

- 軽く混ぜてから遠心機でクイックスピンする。
※Lysis Buffer には界面活性剤が含まれているため、混合時に泡が発生しないように注意する。
- 12.5 µl ずつ CSS を PCR チューブまたは 96-well plate に分注する。
- PCR チューブまたは 96-well plate の蓋をして、遠心機でクイックスピンする。
- PCR チューブまたは 96-well plate を -20°C で最短 10 分間、最長 24 時間保管する。
※ソーティングバッファの量が少ないため、使用直前まで -20°C で保管する。
- 細胞をソートする準備ができたなら、準備しておいた PCR チューブもしくは 96-well plate の蓋を開封し、FACS の操作手順に従って細胞をソートする。
- PCR チューブであれば蓋を閉じ、96-well plate であればアルミホイルシールで密封する。蒸発を最低限に抑えるためにしっかり閉じる。
- 遠心機でクイックスピンする。
- サンプルをドライアイス上に置き、細胞を急速冷凍する。
※PCR チューブで凍結させる場合は、チューブラックでチューブを固定する。
- cDNA 合成の準備が整うまでサンプルを -80°C で保管する。
※長期間の -80°C 保管は cDNA 合成の効率に影響を及ぼす可能性があるため、保管は数週間程度に抑えてください。

ポジティブコントロールを準備する場合は、**B. RNA もしくは細胞サンプルから開始する場合**へ進む。

B. RNA もしくは細胞サンプルから開始する場合

Control RNA の希釈（ポジティブコントロールの準備）

- 396 µl の Nuclease-Free Water に 4 µl の RNase Inhibitor を加え、ボルテックスで混合後氷上に静置する。これを RNase Inhibitor Water (RI Water) とする。
- 新しい 0.2 ml チューブに 38 µl の RI Water と 2 µl Control Total RNA (1 µg/µl) を混合し 50 ng/µl Control Total RNA を作製する。
- 新しい 0.2 ml チューブに 45 µl の RI Water と 5 µl の Control Total RNA (50 ng/µl) を加え混合し 5 ng/µl Control Total RNA を作製する。
- 新しい 0.2 ml チューブに 95 µl の RI Water と 5 µl の Control Total RNA (5 ng/µl) を混合し 0.25 ng/µl Control Total RNA を作製する。
- 新しい 0.2 ml チューブに 120 µl の RI Water と 5 µl の Control Total RNA (0.25 ng/µl) を混合し 10 pg/µl Control Total RNA を作製する。
- 新しい 0.2 ml チューブに 45 µl の RI Water と 5 µl の 10 pg/µl Control Total RNA を混合し 1 pg/µl Control Total RNA を作製する。
- 2-10 µl の 10 pg/µl Control Total RNA もしくは 10 µl の 1 pg/µl Control Total RNA をポジティブコントロールとして使用する。
- 10X Reaction Buffer 溶液を作製し（サンプル数に応じて作製量を変更すること）、軽く混合してから遠心機でクイックスピンする。

19 µl	10X Lysis Buffer
1 µl	RNase Inhibitor
20 µl	Total volume per reaction

※Lysis Buffer には界面活性剤が含まれているため、混合時に泡が発生しないように注意する。

- 精製済の total RNA 1~10.5 µl を新しい PCR チューブまたは 96-well plate に移す。必要に応じて、Nuclease-Free Water を加えて総量を 10.5 µl にする。コントロールサンプルについては表 2 を参考に調製する。

表 2. 逆転写反応サンプル調製

Components	Negative control	Positive control	Experimental sample
10× Reaction Buffer	1 µl	1 µl	1 µl
Nuclease-Free Water	10.5 µl	Up to 9.5 µl	Up to 9.5 µl
Diluted Control RNA	—	1-10.5 µl	—
Sample	—	—	1-10.5 µl
Total volume	11.5 µl	11.5 µl	11.5 µl

- 10X Reaction Buffer を 1 µl ずつ各サンプルに添加する。
- サンプルを氷上に置き、1 µl の 3' SMART-Seq CDS Primer II A を加える。軽くボルテックスで混合し、遠心機でクイックスピンする。
- 速やかに次の工程へ進む。

逆転写反応から 2 本鎖 cDNA 増幅

コンタミネーションを防ぐため、クリーンな環境で作業を実施してください。

- One-Step Buffer のみ室温で解凍し、その他の 1 本鎖 cDNA 合成に必要な試薬（酵素は除く）は氷上で解凍する。
 - Nuclease-Free Water
 - SMART-Seq HT
 - Oligonucleotide, RNase Inhibitor
 - 3' SMART-Seq CDS Primer II A (必要に応じて使用)
 上記の試薬を軽くボルテックスで混合し、クイックスピン後、氷上に静置する。ただし、One-Step Buffer は室温で静置する。
- オプション：細胞サンプルを扱う場合、プレートもしくは PCR チューブを保冷庫から取り出して遠心機でクイックスピンする。
 ※この時点で sorting buffer に 3' SMART-Seq CDS Primer II A を添加していない場合は、それぞれのサンプルに氷上で 3' SMART-Seq CDS Primer II A を 1 µl 添加する。
- 予熱しておいたサーマルサイクラーでサンプルを 72°C (with a heated lid)、3 分間インキュベートする。
- サンプルの反応中に、総サンプル数×1.1 倍量の One-Step Master Mix を室温で作製する。
 ※One-Step Master Mix を使用する直前まで酵素は添加し

ない。

※SeqAmp DNA Polymerase の使用量は厳密である必要があるため、1 度に作製する One-Step Master Mix は 12 サンプル分以上の量を推奨する。

One-Step Master Mix:

0.7 µl	Nuclease-Free Water
8 µl	One-Step Buffer
1 µl	SMART-Seq HT Oligonucleotide
0.5 µl	RNase Inhibitor
0.3 µl	SeqAmp DNA Polymerase
2 µl	SMARTScribe Reverse Transcriptase (100 U/µl)
12.5 µl	Total volume per reaction

- 作製した One-Step Master Mix はボルテックスで穏やかに、かつ十分に混合し、遠心機でクイックスピンする。
- 72°C (with a heated lid) で 3 分間インキュベートし、速やかに氷上に移動して 2 分以上静置する。(ただし 10 分以上は置かないこと)
- サーマルサイクラーを 42°C に予熱しておく。
- One-Step Master Mix に SMARTScribe Reverse Transcriptase と SeqAmp DNA Polymerase を添加し、ボルテックスで穏やかに、かつ十分に混合する。その後遠心機でクイックスピンする。
- それぞれのサンプルに 12.5 µl の One-Step Master Mix を加え、穏やかなボルテックスで十分混合した後、遠心機でクイックスピンする。
- プレートまたはチューブを、42°C に予熱しておいたサーマルサイクラー (with a heated lid) へセットし反応を開始する。

42°C	90 min
95°C	1 min
N cycles*:	
98°C	10 sec
65°C	30 sec
68°C	3 min
72°C	10 min
4°C	forever

※サイクル数は表 3 と表 4 を参照すること。

表 3. 細胞株と精製 RNA サンプルの推奨 PCR サイクル数

Input amount of total RNA	Input amount of cells	Recommended PCR cycles
1 ng	100 cells	10-11
100 pg	10 cells	14-15
10 pg	1 cell	17-19

表 4. シングルセルサンプルの推奨 PCR サイクル数

Sample type	Approximate RNA content	Recommended PCR cycles
K562/HEK293	10 pg	17-18
Jurkat	5 pg	18-19
B or T cells	2 pg	20
PBMCs	1 pg	20

※21 以上のサイクル数については推奨しない。

□SAFE STOPPING POINT：サンプルを 4°Cで一晩、もしくは -20°Cで長期間保管可能

増幅した cDNA 産物の精製

【事前の試薬準備】

- NucleoMag NGS Clean-up and Size Select beads (製品コード 744970)を新しい 1.5 ml チューブに必要量移し、これと Elution Buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5)を少なくとも 30 分間室温に戻す。ボルテックスでよく攪拌する。
- ビーズ量：サンプル量は 1:1 とする。
- 1 サンプルにつき 400 µl の新鮮な 80%エタノールを準備する。

1. それぞれのサンプルに 25 µl のビーズを添加し、3~5 秒間ボルテックスまたは 10 回以上のピペッティングでしっかり攪拌する。
2. 室温で 8 分間インキュベートして、cDNA をビーズに結合させる。
3. サンプルを遠心機でクイックスピンする。
4. サンプルを磁気分離装置上に 5 分以上置き、上清が完全に透明になったことを確認する。
5. サンプルを磁気分離装置にセットした状態で、上清を取り除く。
6. 磁気分離装置上で各サンプルに 200 µl の 80%エタノールを添加する。
7. 30 秒間インキュベートしてから、上清を取り除く。cDNA はビーズに結合したままである。
8. 磁気分離装置上で各サンプルに 200 µl の 80%エタノールを添加する。

9. 30 秒間インキュベートしてから、上清を取り除く。
10. サンプルを遠心機でクイックスピンする。
11. サンプルを磁気分離装置に 30 秒間静置した後、ピペットにより残留したエタノールを除去する。
12. ペレットの光沢がなくなり亀裂が入る直前まで、サンプルを室温で約 2~2.5 分間インキュベートする。
※ビーズの乾燥が進みペレットに亀裂が生じると、DNA がビーズから溶出されにくくなり、結果的に収量が低下する可能性があるので注意する。
13. サンプルを磁気分離装置から外し、17 µl の Elution Buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5)を加えてペレットを覆う。
14. ピペッティングまたは穏やかなボルテックスでビーズを完全に懸濁する。
15. サンプルを室温で 2 分間インキュベートした後に遠心機でクイックスピンする。
16. サンプルを磁気分離装置にセットして 1 分間以上静置し、上清が透明になるまで待つ。
17. 精製 cDNA を含む透明な上清を、新しいチューブまたはプレートに移す。ビーズを持ち込まないように注意する。
18. 速やかに次の工程に進めるか、サンプルを -20°Cで保管する。

□SAFE STOPPING POINT：サンプルを -20°Cで一晩保管可能

cDNA の品質確認

A. cDNA の分子量確認

【使用推奨機器】

- Agilent 2100 Bioanalyzer and Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent, 製品コード 5067-4626)
 - Fragment Analyzer and High Sensitivity Large Fragment Analysis Kit (Agilent, 製品コード DNF-464)
 - High Sensitivity D5000 ScreenTape (Agilent, 製品コード 5067-5592)
1. それぞれの cDNA 増幅産物 1 µl を Agilent 2100 Bioanalyzer and Agilent High Sensitivity DNA Kit で解析す

る。機器の使用方法については、機器製造元の説明書を参照すること。

cDNA 合成と増幅が成功した場合、Agilent High Sensitivity DNA Kit においてポジティブコントロールで 400~10,000 bp の範囲に増幅産物が見られ、ピーク長は約 2,500 bp となります。ネガティブコントロールについては、何もなくフラットである必要がありますが、場合によっては 100~300 bp の範囲に少量の生成物が見られることがあります。

B. cDNA の収量確認

増幅した cDNA の濃度を正確に定量するために、Agilent High Sensitivity DNA Kit の使用を推奨します。Agilent High Sensitivity DNA Kit において 400~9,000 bp の範囲を選択し、ds cDNA の濃度を算出します。機器の使用方法については、機器製造元の説明書を参照してください。

1. cDNA の収量を測定する。

Agilent High Sensitivity DNA Kit においてフラットな波形が見られるようなネガティブコントロールについて、PicoGreen または Qubit を使用し cDNA を定量すると、最大 200 pg/μl の収量が確認される場合があります。これは低分子量のプライマーまたはプライマーダイマーに起因します。

2. サンプルとコントロールの結果を比較する。

3. イルミナシーケンシングのためのライブラリー調製に進む。

※ライブラリー調製まで一貫して実施可能な SMART-Seq® mRNA HT LP (製品コード 634792~634794)の使用を推奨。

本製品を購入する際の注意事項

この製品は研究用途のみに使用できます。ヒトへの使用、治療または診断を含む他の目的に使用することはできません。当社の製品を第三者に譲渡することや、再販、再販のための改造、商業製品の製造を行うには事前に当社から書面による承認を得る必要があります。また、製品 Web ページに記載の該当するライセンス要件についても遵守する必要があります。

タカラバイオ株式会社

製品に関するご質問は下記お問い合わせ先までご連絡ください。

テクニカルサポートライン

Tel : 077-565-6999
Fax : 077-565-6995